

4/5/1

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009671693

WPI Acc No: 1993-365245/199346

XRAM Acc No: C93-161937

New polypeptide contg. heparin-binding domain - has intercellular adhesion activity and cancer metastasis inhibiting activity

Patent Assignee: TAKARA SHUZO CO LTD (TAKI)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 5271291	A	19931019	JP 91238935	A	19910827	199346 B
JP 2729712	B2	19980318	JP 91238935	A	19910827	199816

Priority Applications (No Type Date): JP 91117886 A 19910423

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

JP 5271291 A 13 C07K-013/00

JP 2729712 B2 20 C07K-014/78 Previous Publ. patent JP 5271291

Abstract (Basic): JP 5271291 A

A functional polypeptide of the formula A-(B)^m-(C)ⁿ (I): A = 278 amino acid polypeptide Seg. No. 1); B = polypeptide Asn-Val-Ser-Pro-Pro-Arg-Ala- Arg-Val-Thr-Asp-Ala-Thr-Glu-Thr-Thr-Ile-Thr-Ser-Trp -Arg- Thr-Lys-Thr-Glu-Thr-Ile-Thr-Gly-Phe-Gln-Val-Asp-Ala-Val-Pro Ala-Ans-Gly-Gln-Thr-Ile-Gln -Arg-Thr-Ile-Lys-Pro-Asp-Val -Arg-Ser-Tyr-Thr-Ile-Thr-Gly -Leu-Gln-Pro-Gly-Thr-Asp-Tyr-Lys- Ile-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Leu-Asn -Asp-Asn-Ala-Arg-Ser-Ser-Pro-Val- Val-Ile-Asp-Ala-Ser-Thr. C = polypeptide Ala-Ile-Asp -Ala-Pro-Ser-Asn-Leu- Arg-Phe-Leu-Ala-Thr-Thr-Pro -Asn-Ser-Leu-Leu-Val-Ser-Trp-Gln- Pro-Pro-Arg-Ala-Arg-Ile-Thr -Gly-Tyr-Ile-Ile-Lys-Tyr-Glu-Lys -Pro-Gly-Ser-Pro-Pro-Arg-Glu -Val-Val-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Gly -Val-Thr-Glu-Ala-Thr-Ile-Thr -Gly-Leu-Glu-Pro-Gly-Thr-Glu-Tyr -Thr-Ile-Tyr-Val-Ile-Ala-Leu -Lys-Asn-Ans-Gln-Lys-Ser-Glu-Pro- Leu-Ile-Gly-Arg-Lys-Lys-Thr.

m + n = 1 or 2 and a cancer metastasis inhibitor contg. the above functional polypeptide.

USE/ADVANTAGE - The new low molecular polypeptide has both intercellular adhesion activity and cancer metastasis inhibiting activity. In an example, Heparin-combining domain from E coli HB101/pHD101 was introduced to E coli BW313. A double-stranded DNA was derived and digested by NcoI-BamHI to give 0.54 kb band. It was ligated with NcoI-BamHI fragment of plasmid pTF7520 and introduced to E coli HB101. A plasmid was extracted from it and named pCHU179. III-12 and III-14 of H-271 was deleted from it to give pCHV89. pCHV90 was also prep. Their intercellular adhesion activities, heparin-combining activities and reactivities with monoclonal antibody against heparin-combined domain were determined. Their doses inhibited lung metastasis of melanoma in mouse.

Dwg.0/0

Title Terms: NEW; POLYPEPTIDE; CONTAIN; HEPARIN; BIND; DOMAIN; ADHESIVE; ACTIVE; CANCER; METASTASIS; INHIBIT; ACTIVE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-013/00; C07K-014/78

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; A61K-038/00;

C12N-001/21; C12N-015/09; C12N-015/62; C12N-015/70; C12P-021/02;

C12R-001-19

File Segment: CPI

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-271291

(43)公開日 平成5年(1993)10月19日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00	Z NA	8619-4H		
A 6 1 K 37/02	ADS			
	ADU	8314-4C		
// C 1 2 N 15/62				
15/70				

審査請求 未請求 請求項の数2(全13頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-238935	(71)出願人	591038141 賣酒造株式会社 京都府京都市伏見区竹中町609番地
(22)出願日	平成3年(1991)8月27日	(72)発明者	東市郎 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号
(31)優先権主張番号	特願平3-117886	(72)発明者	済木育夫 北海道札幌市厚別区厚別北3条5丁目12-6
(32)優先日	平3(1991)4月23日	(72)発明者	田口由紀 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賣酒造株式会社中央研究所内
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	弁理士 中本宏(外2名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】機能性ポリペプチド

(57)【要約】

【目的】細胞接着活性とガン転移抑制活性を合せもつ新規な機能性ポリペプチドを提供する。

【構成】一般式(化1) : A - (B)_m - (C)_n
(式中Aは、配列表の配列番号1で表されるポリペプチド、Bは、配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、Cは、配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、nは1又は0の数を示す。但し m、nの和は1以上である)で表される機能性ポリペプチド。フィプロネクチン由来のポリペプチドの結合等により製造される。大腸菌による発現も確認した。

【効果】ガン転移抑制作用のほか、創傷部の組織の修復や、恒常性の維持に寄与する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(化1) :

【化1】 A-(B)_m-(C)_n

(式中Aは配列表の配列番号1で表されるポリペプチド、Bは配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、Cは配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、nはそれぞれ1又は0の数を示す。但しm、nの和は1以上である)で表されることを特徴とする機能性ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載の機能性ポリペプチドを含有することを特徴とするガン転移抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規ポリペプチドに関し、更に詳しくは細胞接着活性とガン転移抑制活性の両活性を有する新規なポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】フィプロネクチン(以下、FNと表示する)は、血漿や細胞外マトリックスに存在する糖タンパク質で、多彩な機能を持つことが知られている〔アニュアルレビュー オブ バイオケミストリー(Annual Review of Biochemistry)、第57巻、第375~413頁(1988)〕。天然のFNを創傷治癒、点眼薬等の医薬品や化粧品に利用する試みがなされているが、血液から採取するために、供給に制限があること、コスト高であること、また、病原性の細菌やウイルス等による汚染の可能性があること等の理由により、実用化されていない。FNにはヘパリンに結合する領域(ヘパリン結合ドメイン)が2ヶ所存在し、1ヶ所はN末端付近にあり、結合にCaイオンが必要であることが知られている。もう一方の領域はC末端付近にあり、この領域のヘパリンに対する結合活性は、前述の領域よりも強く、しかもCaイオンに影響されない。最近の研究からFNのヘパリン結合ドメインが、細胞接着ドメインと同様に線維芽細胞、内皮細胞、ある種のガン細胞等の接着、伸展、移動に重要な役割を果していることが次第に明らかとなってきた。FNのヘパリン結合ドメインは細胞の表層にあるプロテオグリカンに結合して、細胞と細胞外マトリックスとの相互作用を引起すことにより、細胞の接着、伸展、移動等に寄与すると考えられる。したがって、細胞接着ドメイン構造とヘパリン結合ドメイン構造の両構造を持つポリペプチドは、細胞と細胞外マトリックスの両方に結合して創傷部の組織の修復や、恒常性の維持に寄与し、医薬品としての用途が期待できる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは特開平2-311498号公報に記載のヒトFNの細胞接着ドメインと、ヘパリン結合ドメインが、直接又はリンクアーペプチドを介して結合した機能性ポリペプチドを創製し、該ポリペプチドがガン転移抑制作用等の生理活性を示す

ことを既に見出している(特開平3-127742号、特願平1-306145号、同2-165727号各明細書)。ガン転移抑制作用、脈管形成抑制作用等の生理活性は、機能性ポリペプチドの構造、特に該ポリペプチドのヘパリン結合ドメイン由來のポリペプチドの構造により異なることより、更にヘパリン結合ドメイン由來のポリペプチド部の構造の異なる上記機能性ポリペプチドの開発が望まれている。本発明の目的は上記現状にかんがみ、ヘパリン結合ドメイン由來のポリペプチド部の構造の異なる細胞接着活性とガン転移抑制活性を合せもつ機能性ポリペプチド、及び該ポリペプチドを含有するガン転移抑制剤を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は機能性ポリペプチドに関し、下記一般式(化1) :

【化1】 A-(B)_m-(C)_n

(式中Aは配列表の配列番号1で表されるポリペプチド、Bは配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、Cは配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、nはそれぞれ1又は0の数を示す。但しm、nの和は1以上である)で表されることを特徴とする。また本発明の第2の発明はガン転移抑制剤に関し、本発明の第1の発明の機能性ポリペプチドを含有することを特徴とする。

【0005】配列表の配列番号1のアミノ酸番号1~277はヒトFNの細胞接着ドメインの Pro¹²³⁹-Ser¹⁵¹⁵と同一配列であり、配列表の配列番号2はヒトFNのヘパリン結合ドメインの Asn¹⁷⁸²-Thr¹⁸⁷⁰と同一配列であり、配列表の配列番号3は同じくヘパリン結合ドメインの Ala¹⁸⁷¹-Thr¹⁹⁶⁰と同一配列である。

【0006】なお、本明細書において、アミノ酸に付与された肩数字は、EMBLデータバンク(EMBL DATA BANK)のFNのcDNAを翻訳して得られるアミノ酸に付与されたN末端からのアミノ酸残基数を示す。

【0007】ヒトFNの遺伝子構造については、ジエンボジャーナル(The EMBO Journal)、第4巻、第1755~1759頁(1985)に記載されている。また、その細胞接着ドメイン及びヘパリン結合ドメインをコードするcDNAクローン(pLF5、pLF3、pLF4及びpLF5)についてはバイオケミストリー(Biochemistry)、第25巻、第4936~4941頁(1986)に記載されている。本発明者らは、pLF5から、細胞接着ドメインに対するcDNA断片を取出し、これを発現ベクターに接続して大腸菌に導入することにより、細胞接着活性ポリペプチド及びその製造方法を開発し特許出願した(特開平1-206998号)。本発明で必要とされる細胞接着ドメインのcDNAは、特開平1-206998号公報に記載されている組換え体プラスミドpTF7021を用いることができる。pTF7021

はFNの Pro¹²³⁹ - Met¹⁵¹⁷ (279アミノ酸残基) を発現するプラスミドである。pTF7021 の翻訳領域のC末端の終止コドンの直前にクローニングサイト、例えばNco I サイトを導入することにより、細胞接着ドメインのcDNAと他のドメインのcDNAを連結させることができる。特開平2-311498号公報に記載のように pTF7021にNco I サイトを導入したプラスミドは pTF7520と命名され、該プラスミド中に Pro¹²³⁹ - Ser¹⁵¹⁵ - Met の配列がコードされている。

【0008】ヘパリン結合ドメインについてはトリプシン、サーモライシン、カテプシンD等によって分解されて得られた断片が報告されており、その大きさは、29 kDから38 kDに及んでいる。ドメインの詳しい特定はなされていないが、一般的には約90アミノ酸から成る I II型類似配列を3個 (III-12、III-13、III-14) と、それに続く IIIcs型配列の一部を含む断片が知られている。

【0009】ヘパリン結合ドメインをコードするcDNAは、pLF2435から取出すことができる。pLF2435は、前記pLF2、pLF3、pLF4及びpLF5から再構築されたプラスミドで、FNのヘパリン結合ドメインをコードするcDNAを含んでいる。pLF2435から必要なcDNA断片を制限酵素で切出し、5'側に開始コドンを含む合成DNAを、また、3'側には、終止コドンを含む合成DNAをDNAリガーゼで連結した後、適当な発現ベクターに接続することにより、特開平2-311498号公報に記載のIII型類似配列が3個つらなった配列を有するペプチド (H-271) を発現するプラスミドpHD101を得ることができる。

【0010】プラスミドpTF7520 及びプラスミドpHD101について特開平2-311498号公報中に更に詳細に記述されている。CHV-179、CHV-90及びCHV-89は、それぞれヘパリン結合ドメインのIII型リピートのうち、III-13及びIII-14、III-14、及びIII-13が細胞接着ドメインポリペプチド (Pro¹²³⁹ - Ser¹⁵¹⁵) のC末端にメチオニン残基を介して結合したポリペプチドである。これらを発現するプラスミドは、例えば次のようにして構築することができる。ヘパリン結合ドメインのポリペプチド (H-271) をコードするプラスミドpHD101のIII-13のN末端、又はC末端に対応する領域にNco I サイトを導入し、Nco IとBam HIで消化してIII-14、又はIII-13及びIII-14をコードするDNA断片を得る。これを細胞接着ドメインポリペプチドをコードしているプラスミドpTF7520 (特開平2-311498号) のNco I - Bam HI サイトに接続することにより、CHV-179及びCHV-90をそれぞれ発現するプラスミドpCHV179 及びpCHV90が得られる。次いで、CHV-179を発現するプラスミドから、部位特異的変異の手法で、III-14をコードする配列を欠失させることによ

り、CHV-89を発現するプラスミドpCHV89を得ることができる。

【0011】前記プラスミドにおける連結部には、Nco I サイトに由来するメチオニン残基がリンカーとして含まれる。リンカーの有無は、本発明の効果を左右するものではないが、必要とあれば部位特異的変異の手法により、容易に除去することができる。また、任意のスペーサーを分子間距離の調節のため挿入することもできる。

【0012】配列表の配列番号4のアミノ酸配列をコードするプラスミドpCHV89、配列表の配列番号5のアミノ酸配列をコードするプラスミドpCHV179、配列表の配列番号6のアミノ酸配列をコードするプラスミドpCHV90をそれぞれ例えれば、大腸菌に導入し、適当な条件下に培養することにより、目的ペプチドが大腸菌内に蓄積される。発現の確認にはイムノプロッティングが用いられる。組換え大腸菌の全菌体タンパク質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後、泳動パターンをニトロセルロース膜に移し取る。FNの細胞接着ドメインを認識するモノクローナル抗体 (FN-10、宝酒造) 、及びFNのヘパリンドメインを認識するモロクローナル抗体 (IST-1又はIST-2、セラ・ラブ社) 等を用いて検出されるバンドが目的のポリペプチドである。目的ポリペプチドの精製は、例えば次のように行う。組換え大腸菌をL-プロロス等の培地に培養し、集菌した後、超音波処理により、菌体破碎液を得、これを遠心分離して上清を得る。上清を透析後、DEAEイオン交換体のカラムで分画し、次いで抗体カラム及び/又はヘパリンーアガロース等のアフィニティクロマトを行う。以上の操作により、目的のポリペプチドを精製することができる。

【0013】得られたポリペプチドは、BHKやNRK細胞に対する細胞伸展活性の測定及びヘパリン結合活性の測定に用いられる。細胞伸展活性の測定は、例えばルオスラティ (Ruoslathi) らの方法 [メソッズ インエンザイモロジー (Methods in Enzymology) 、第82巻、第803~831頁 (1981)] に準じて行う。すなわち、試料をコートした後、BSAでプロッキングしたマイクロタイタープレートに、BHK又はNRK細胞の懸濁液を添加し、37°Cで約1時間インキュベートした後、未吸着の細胞を洗浄した後、ホルマリン固定して、伸展した細胞の割合を顕微鏡下に測定することにより、細胞伸展の強さを測定することができる。一方、ヘパリン結合活性は、ヘパリンを結合した担体、例えばAF-ヘパリントヨパール (Toyopearl、東ソー) のカラムに試料を吸着させ、NaClの塩濃度を上昇させて溶出させ、溶出された塩濃度により、ヘパリンへの結合能力を示すことができる。

【0014】以上の測定により、本発明のポリペプチドはBHKやNRK細胞に対して強い細胞伸展活性を示すと共に、CHV-179、CHV-89はそれぞれヘパ

リンに対しても強い親和性を示すことが証明される。

【0015】本発明のポリペプチドを医薬として使用する場合、必要に応じて医薬用担体と共に常法により製剤化し、経口投与又は非経口投与すればよい。賦形剤あるいは担体としては薬理学的に許容されるものが選ばれ、その種類及び組成は投与経路や投与方法によって異なる。例えば液状担体として水、アルコール類若しくは大豆油、オリーブ油、ミネラル油等の動植物油、又は合成油が用いられる。固体担体としてマルトース、シュークロースなどの糖類、アミノ酸類、ヒドロキシプロビルセルロースなどのセルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウムなどの有機酸塩などが使用される。

【0016】注射剤の場合は溶解液は生理食塩液、各種緩衝液、グルコース、イノシトール、マンニトール、ラクトースなどの糖類溶液、エチレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が望ましい。またイノシトール、マンニトール、ラクトース、シュークロース等の糖類、フェニルアラニン等のアミノ酸等の賦形剤と共に凍結乾燥製剤とし、それを投与時に注射用の適当な溶剤、例えば滅菌水、生理食塩液、ブドウ糖液、電解質溶液、アミノ酸溶液等静脈投与用液体に溶解させて投与することもできる。製剤中における本発明のポリペプチドの含量は製剤により異なるが、通常0.1～10.0重量%好ましくは1～9.8重量%である。例えば注射液の場合には、通常0.1～3.0重量%、好ましくは1～1.0重量%の有効成分を含むようになることが望ましい。経口投与する場合には前記固体担体若しくは液状担体と共に、錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、液剤、ドライシロップ剤等の形態で用いられる。カプセル、顆粒、粉剤は一般に5～10.0重量%、好ましくは2.5～9.8重量%の有効成分を含む。

【0017】投与量は、患者の年令、体重、症状、治療目的等により決定されるが治療量は一般に、非経口投与で1～100mg/kg/日、経口投与で5～50.0mg/kg/日である。

【0018】本発明のポリペプチドはB16メラノーマを用いる転移のモデル系にて有意な転移防止効果を示すもので、胃ガン、肺ガン、大腸ガン、乳ガン、前立腺ガン、子宮頸ガン、腎ガンなどガン細胞に対して良好に転移を防止せしめてなる有用なものである。

【0019】以上詳細に説明した様に、遺伝子工学的手法により、細胞接着活性とガン転移抑制剤活性を併せ持ち、新規な機能性ポリペプチドを効率よく提供することができる。該ポリペプチドは抗転移抑制剤としての用途のほか、脈管形成抑制剤、創傷治癒剤、生長促進剤等の医薬品として、また、化粧料、培養基材等として有用である。

【0020】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

【0021】実施例1

ヘパリン結合ドメインの一部と細胞接着ドメインポリペプチドとの融合タンパク質の構築

なお、図1は融合タンパク質を発現するプラスミドの構築工程を示す図である。Escherichia coli HB 101/pHD101 (FERM BP-2264) より調製したヘパリン結合ドメインをコードするプラスミドpHD101 (特開平2-311498号) を大腸菌BW313に導入し、ヘルペスファージM13K07を感染させてdUを含む一本鎖DNAを調製した。これをテンプレートとし、Nco I認識配列を含む配列表の配列番号6で表す合成DNAをプライマーとして、T4 DNAポリメラーゼを作用させ、相補鎖合成を行った。なお、プライマーは、ポリヌクレオチドキナーゼにより、あらかじめ5'末端をリン酸化した。得られた2重鎖DNAを大腸菌DNAリガーゼで環状化し、宿主菌の大腸菌BME71-18mutS株に導入して、複製させた。得られた形質転換体からプラスミドを抽出しNco Iで切断してゲル電気泳動で約0.27kbのバンドを与えるプラスミドを選択した。このようにして、ヘパリン結合ドメインのIII-13のN末端 (Asn¹⁷⁸²)と、III-12のC末端 (Glu¹⁷⁸¹)をコードする配列の間にNco Iサイトを導入したプラスミドを得た。なお、この変異導入には市販の変異導入キット (ミュータンK、宝酒造) を用いた。このプラスミドを、Nco IとBam HIで消化してゲル電気泳動を行い、約0.54kbのバンドをゲルから抽出した。一方、Escherichia coli JM 109/pTF 7021 (FERM BP-1941) より前述の組換え体プラスミドpTF 7021を調製し、次いで該プラスミドにNco Iサイトを導入した。Nco Iサイトの導入は特開平2-311498号公報に記載のように、配列表の配列番号7で表すオリゴヌクレオチドを合成し、前出ミュータンKを用いて行い、プラスミドpTF 7520を得た。前記0.54kbのDNA断片をNco IとBam HIで消化したpTF 7520とT4 DNAリガーゼで連結した後、大腸菌HB101に導入した。得られた形質転換体から、プラスミドを抽出し、Nco Iと、Bam HIで消化したときに、0.54kbのバンドを与えるプラスミドを選択した。このプラスミドをpCHV179と命名した。pCHV179は、H-271のIII-12を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドと細胞接着ドメインポリペプチド (Pro¹²³⁹-Ser¹⁵¹⁵)がメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであることをDNAの塩基配列分析によって確認した。pCHV179を導入した大腸菌HB101をEscherichia coli HB101/pCHV179と命名、表示して工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した〔微研菌寄第12183号 (FERM P-12183)〕。

【0022】同様にして、Nco Iサイトを含む配列表の配列番号8で表す変異導入プライマーを用いて、pHD101に変異導入を行い、III-13のC末端 (Thr¹⁸⁷⁰)と

III-14のN末端 (Ala^{1871})をコードする配列間に Nco I サイトを導入したプラスミドを得た。これを Nco I と Bam HI で消化して約 0.27 kb のバンドを切り出し、pTF7520の Nco I - Bam HI サイトに接続して、大腸菌 HB 101 に導入した。得られた形質転換体から、プラスミドを抽出し、 Nco I と Bam HI で消化したとき 0.27 kb のバンドを与えるプラスミドを選択し、このプラスミドを pCHV 90 と命名した。pCHV 90 は、H-271 の III-12 と III-13 を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドを細胞接着ドメインポリペプチドがメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであることを DNA の塩基配列分析により確認した。pCHV 90 を導入した大腸菌 HB 101 を Escherichia coli HB 101/pCHV 90 と命名した。

【0023】次いで、pCHV179から、III-14をコードする領域を欠失するために欠失導入プライマーとして III-13 の C 末端をコードする配列に相補的な配列と、ストップコドン以下の配列に相補的な配列とが直接結合した配列表の配列番号 9 で表す 30 塩基のオリゴスクレオチドを合成した。これをプライマーとして前記の方法で相補鎖を合成し、DNA リガーゼで閉環した後、大腸菌 BMH71-18mutS を形質転換し、得られたプラスミドを Nco I と Bam HI で消化して、0.27 kb の断片を生成するものを目的的変異体として選択した。最終的には、塩基配列分析により、変異を確認した。このようにして得られたプラスミドは H-271 の III-12 と II-14 を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドと細胞接着ドメインポリペプチドがメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであり、該プラスミドを pCHV89 と命名した。これを再び大腸菌 HB 101 に導入して、得られた形質転換体を Escherichia coli HB 101/pCHV89 と命名、表示して工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した〔微研菌寄第 12182 号 (FERM P-12182)〕。

【0024】実施例 2

CHV-89、CHV-90、及び CHV-179 の大腸菌による生産と精製

pCHV89 を導入した Escherichia coli HB 101/pCHV 89 (FERM P-12182) を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンビシリソウを含む 5 ml の L-ブロス培地に接種し、37°C、1 夜振とう培養した。これを 500 ml の同培地に接種して振とう培養し、 660 nm の吸光度が 0.3 のときに、 2 mM の IPTG を添加して、更に 20 時間培養した。次に遠心分離により集菌し、 1 mM EDTA、 5 mM メルカプトエタノール、 $3 \mu\text{M}$ p-アミジノフェニルメタンスルホニルフルオライドを含む 20 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.0) に懸濁した。これを超音波処理した後、遠心分離を行って 25 ml の上清を得た。上清を DEAE-トヨパール 650M (15 ml) をカラム

10

20

30

40

50

に吸着させ、カラムを 20 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.0) で洗浄後、バッファー中の NaCl 濃度の上昇により吸着物を分画した。イムノプロッティングにより検出された目的画分を集め、 20 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.0) で平衡化した抗体カラム (FN-10) を結合させたセファロース 4B (10 ml) に吸着させ、次に 0.1 M NaCl を含む同バッファー、 20 mM 酢酸アンモニウムの順に洗浄した後、 40 mM 酢酸で目的画分を溶出した。その中で SDS-PAGE で单一のバンドを与える画分を集めて、脱塩、凍結乾燥した。このようにして 500 ml の培養菌体から約 5 mg の CHV-89 を得た。この CHV-89 の一部をプロテインシーケンサー (477A/120A、アプライドバイオシステムズ社) で分析して、N 末端配列を確認した。また、カルボキシペプチダーゼ P 消化法により、C 末端アミノ酸を確認した。

【0025】同様の方法により、pCHV179 を導入した Escherichia coli HB 101/pCHV179 (FERM P-12183) を培養し、 500 ml の培養菌体から、約 5 mg の CHV-179 を得た。また、pCHV90 を導入した Escherichia coli HB 101/pCHV90 の 500 ml 培養液から約 4 mg の CHV-90 を得た。CHV-179、CHV-90 の N 末端アミノ酸、C 末端アミノ酸も、上記と同様の方法でそれぞれ確認した。

【0026】実施例 3

生物活性の測定

前記実施例 2 で得られた各ポリペプチドを用いて細胞接着活性、ヘパリン結合活性及びヘパリン結合ドメインに対するモノクローナル抗体との反応性を測定した。細胞接着活性は、ルオスラティラの方法 [メソッド インエンザイモロジー、第 82 卷、該 803~831 頁 (1981)] に準じて測定した。試料を蒸留水、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) 等に溶かし、96 穴マイクロプレート上で階段的に希釈した。4°C、2 時間インキュベートして、試料をプレート上に吸着させた ($50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$)。3% BSA (牛血清アルブミン) を含む PBS 液を $100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 加え、37°C、1 時間インキュベートしてプレートをブロックした。PBS でプレートを洗浄後、あらかじめダルベッコ (Dulbecco's) イーグル最小栄養培地 (DMEM) に 5×10^5 細胞/ ml となるように懸濁させたベビーハムスター腎細胞 (BHK-21) を $100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 分注し、37°C、1 時間インキュベートした。なお使用した BHK-21 細胞は、凍結保存した株を継代培養後、トリプシン処理 (37°C、5 分) したもの用いた。PBS でプレートを洗浄後、3% ホルマリン溶液で細胞をプレート上に固定した。顕微鏡下で BHK-21 細胞の伸展を観察し、伸展細胞数が、n-FN の高濃度における伸展細胞数の 50% となる試料の濃度 (ED_{50}) を求め細胞接着活性の指標とした。

【0027】ヘパリン結合活性の測定は以下のようにした。20 mMリン酸バッファー(pH 7.0)で平衡化したAFヘパリントヨパール650Mのカラム(1.5 ml)に試料を乗せ、バッファー中のNaCl濃度を段階的に上昇させ、溶出される塩濃度によりヘパリンへの結合力を表した。

【0028】ヘパリン結合ドメインに対するモノクローナル抗体との反応性の測定は、試料1~2 μgをSDS-PAGEで分離し、これをセミドライプロッター(ザルトリウス社)を用いて、ニトロセルロースメンプランにプロッティングした。メンプランをブロッキング液(1%BSAを含むPBS)で処理した後、FNのヘパリン結合ドメインを認識するモノクローナル抗体(IST-1及び-2、セラ・ラブ社)を含むブロッキング液と約1時間インキュベートし、50 mM NaCl及び*

*0.05% NP-40を含む10 mMトリス・HC1バッファー(pH 7.5)でメンプランを洗浄、更にNP-40を含まない上記バッファーでメンプランを洗浄した。次いで、バーオキシダーゼ標識2次抗体(アマシャム社)を含むブロッキング液と約1時間インキュベートし、同様にメンプランを洗浄した。4-クロロ-1-ナフトール及びH₂O₂を含む50 mM NaCl-トリス・HC1(pH 7.5)溶液にメンプランを浸して、メンプランにプロッティングされたバンドを発色させた。

【0029】以上のようにして得られた測定結果を表1に示す。なお、特開平2-311498号公報記載のC₂₇₇-Met-H₂₇₁を対照とし用いた。

【0030】

【表1】

表 1

試 料	細胞接着活性 (ED ₅₀ , nM)	ヘパリン結合活性 (溶出塩濃度, mM)	抗体との反応性	
			IST-1	IST-2
C ₂₇₇ -Met-H ₂₇₁	176	300	有	有
CHV-179	176	300	有	有
CHV-90	176	150	無	無
CHV-89	176	300	有	有

【0031】実施例4

次に本発明のポリペプチドの生理活性を示す。

(1) ガン転移抑制作用

C57BL/6 マウス(1群5匹)にB16-BL6 メラノーマ細胞30×10⁴ 個と本発明のポリペプチド1000 μgを静脈内に注入する(細胞とポリペプチドをPBS中で混合し、その0.05 mlを静注する)。対照としてメラノ※

※一マ細胞のみを静注し、対照群とする。メラノーマ細胞移植後14日目に肺を摘出して、肺表面における転移結節数を実体顕微鏡を用いて測定する。その結果を表2に示す。

【0032】

【表2】

表 2

	投与量 μg/マウス	肺への転移数	
		平均±SD	
対 照	—	45±7	
CHV-89	1000	12±9	
CHV-90	1000	11±5	
CHV-179	1000	4±3	

【0033】以上のように、本発明のポリペプチド投与群で、メラノーマの肺転移が抑制されている。

(2) 急性毒性試験

C57BL/6 マウスにCHV-89、CHV-90、CHV-179をそれぞれ静脈内投与した。100 mg/kgにおいて毒性は認められなかった。

【0035】実施例5

次に、本発明のポリペプチドの製剤例を示す。なお各例において、部は重量部を意味する。

【0036】製剤例1

CHV-89 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2 gを10 mlの50バイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペプ

11

チド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

【0037】製剤例2

CHV-90 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペプチド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

【0038】製剤例3

CHV-179 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペプチド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

【0039】製剤例4

CHV-89 50部、乳糖600部、結晶セルロース330部及びヒドロキシプロピルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を用いて圧縮し、破碎して16～60メッシュの間にるように篩過し、顆粒とした。

【0040】製剤例5

CHV-90 50部、乳糖600部、結晶セルロース330部及びヒドロキシプロピルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を

配列：

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1					5			10				15		
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
								20		25			30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
						35			40			45		
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
						50		55			60			
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
						65		70			75			
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
						80		85			90			
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
						95		100			105			
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
						110		115			120			
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
						125		130			135			
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
						140		145			150			
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
						155		160			165			
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
						170		175			180			
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
						185		190			195			

12

用いて圧縮し、破碎して16～60メッシュの間にるように篩過し、顆粒とした。

【0041】製剤例6

CHV-179 50部、乳糖600部、結晶セルロース330部及びヒドロキシプロピルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を用いて圧縮し、破碎して16～60メッシュの間にように篩過し、顆粒とした。

【0042】

【発明の効果】本発明によりFNのヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチド部の構造が異なり、細胞接着活性とガン転移抑制活性の両活性を合せ持つ新規低分子ポリペプチド及びその製造方法が提供される。このポリペプチドは遺伝子工学的に大量に供給可能であり、創傷治癒等種々の分野で有用な新規タンパク質である。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：278

配列の型：アミノ酸

20 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

13

14

Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 200 205 210
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met
 275

配列番号：2

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：89

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

フラグメント型：中間部フラグメント（ヒトフィブロネ

鎖の数：1本鎖

* クチン）

配列：

Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
 20 25 30
 Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile
 35 40 45
 Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn
 65 70 75
 Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
 80 85

配列番号：3

30※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：90

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

フラグメント型：中間部フラグメント（ヒトフィブロネ

鎖の数：1本鎖

※ クチン）

配列：

Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro
 1 5 10 15
 Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr
 20 25 30
 Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu
 35 40 45
 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr
 50 55 60
 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
 65 70 75
 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 80 85 90

配列番号：4

鎖の数：1本鎖

配列の長さ：367

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列：

15

16

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 110 115 120
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
 125 130 135
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 140 145 150
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
 155 160 165
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 170 175 180
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
 185 190 195
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 200 205 210
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg
 275 280 285
 Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp
 290 295 300
 Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val
 305 310 315
 Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp
 320 325 330
 Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr
 335 340 345
 Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro
 350 355 360
 Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
 365

配列番号: 5

配列の長さ: 457

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1								10					15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
								20					30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
								35					45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
								50					60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
								65					75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
								80					90	
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
								95					105	
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
								110					120	
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
								125					135	
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
								140					150	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
								155					165	
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
								170					180	
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
								185					195	
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
								200					210	
Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
								215					225	
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
								230					240	
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
								245					255	
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg
								260					270	
Thr	Glu	Ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg
								275					285	
Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	Ile	Thr	Ile	Ser	Trp
								290					300	
Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Ala	Val
								305					315	
Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	Ile	Gln	Arg	Thr	Ile	Lys	Pro	Asp
								320					330	
Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr
								335					345	

19

20

Lys	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asp	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro
							350		355					360
Val	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu
							365		370					375
Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gln
							380		385					390
Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Gly	Tyr	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu	Lys
							395		400					405
Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Glu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly
							410		415					420
Val	Thr	Glu	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr
							425		430					435
Thr	Ile	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Glu	Pro
							440		445					450
Leu	Ile	Gly	Arg	Lys	Lys	Thr								
							455							

配列番号：6

鎖の数：1本鎖

配列の長さ：368

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1								5					10	15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
								20					25	30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
								35					40	45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
								50					55	60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
								65					70	75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
								80					85	90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
								95					100	105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
								110					115	120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
								125					130	135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
								140					145	150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
								155					160	165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
								170					175	180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
								185					190	195
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
								200					205	210
Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
								215					220	225

21

22

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn		
275	280	285
Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp		
290	295	300
Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu		
305	310	315
Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro		
320	325	330
Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu		
335	340	345
Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu		
350	355	360
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr		
365		

配列番号：7

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイポセティカル配列：NO

アンチセンス：YES

配列の特徴：1-26 E primer

配列：

GCTGACATTG GCCATGGCTC CAGAGT 26

配列番号：8

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイポセティカル配列：NO

アンチセンス：YES

配列の特徴：1-22 E primer

配列：

CTATTACACC ATGGATGGTT TG 22

配列番号：9

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイポセティカル配列：NO

アンチセンス：YES

配列の特徴：1-22 E primer

配列：

ATCAATGCC ATGGTGGAGG CG 22

30 配列番号：10

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイポセティカル配列：NO

アンチセンス：YES

配列の特徴：1-30 E primer

配列：

40 AGCCGGATCC TATTAAGTGG AGGCCTCGAT 30

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpCHV179、pCHV89、及びpCHV90をそれぞれ構築するための工程図である。

【手続補正書】

【提出日】平成4年1月27日

【手続補正2】

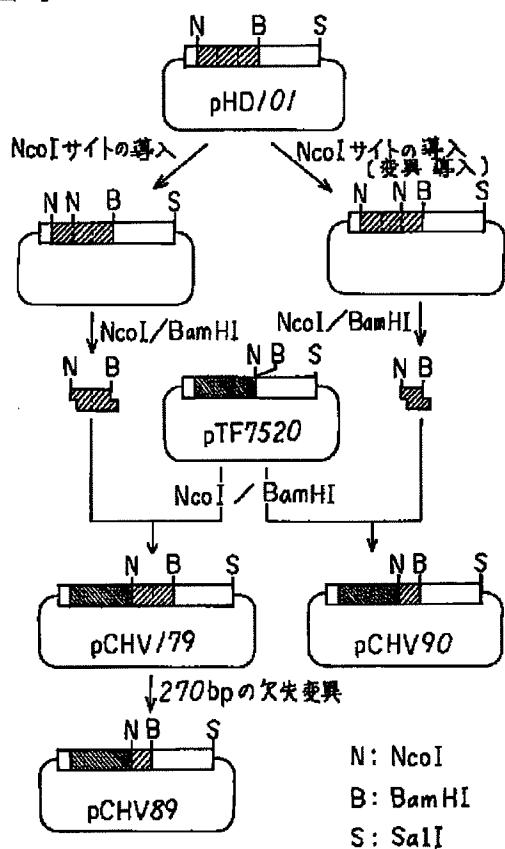
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】追加

【補正内容】

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

C 12 P 21/02

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:19)

識別記号 庁内整理番号

C 8214-4B

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 君塚 房夫

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賽酒造
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賽酒造
株式会社中央研究所内